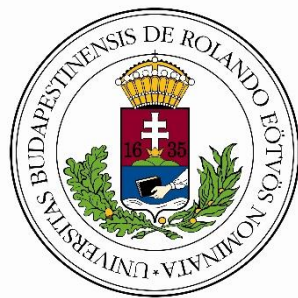


Abiotikus válaszokban szerepet játszó kisRNS-ek azonosítása növényekben újgenerációs szekvenálással

Doktori értekezés tézisei

Baksa Ivett

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar



Biológia Doktori Iskola

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Erdei Anna, MTA rendes tagja

Genetika Program

A Doktori Program vezetője: Dr. Vellai Tibor, DSc, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Szittyá György, PhD, tudományos főmunkatárs

NAIK - Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, Gödöllő

2019

Bevezetés

A növények számára kulcsfontosságú, hogy megfelelően érzékeljék az adott környezetet, mivel képtelenek a helyváltoztatásra. A megváltozott viszonyokhoz való gyors és hatékony adaptációhoz elengedhetetlen egy olyan szabályozó rendszer kialakítása, ami folyamatosan észleli az abiotikus és biotikus faktorokat és ennek megfelelően tudják alakítani a növekedési és fejlődési programjukat. A környezet hőmérséklete a leginkább limitáló faktor a növények túlélése szempontjából, ennek ellenére a hőmérséklet érzékelési és adaptációs folyamatokról keveset tudunk.

Arabidopsisban írták le, hogy a kromatin szerkezetnek meghatározó szerepe van a hőmérsékletérzékelésben (Kumar és Wigge 2010). A kromatin az eukarióta sejt DNS-állományának hiszton fehérjékkel kialakított komplexe, amelynek egyik szerveződési szintje a nukleoszóma. Ebben a gyöngyfüzér-struktúrában hiszton oktamerek fognak közre két fordulaton, 146 bázispárnnyi DNS-t. Az alternatív H2A.Z hisztont tartalmazó nukleoszóma egy szorosabb feltekeredést tesznek lehetővé a DNS számára. Magasabb ambiens hőmérsékleten (27°C) lecsökken a H2A.Z hisztonok aránya a kanonikus H2A variánsával szemben, ami egy lazább kromatinszerkezetet eredményez, így elősegíti a transzkripciót. Mivel a kisRNS-ek fontos kromatin állapot szabályozók a növényekben, feltételezhető, hogy szerepük van a hőmérséklet érzékelésben és az arra adott fiziológiai válaszok szabályozásában is.

Egy korábbi munkánkban bemutattuk, hogy a kisRNS-ek irányította molekuláris paraziták elleni védekezés hőmérsékletfüggő (Szittyá és mtsai. 2003). Azt tapasztaltuk ugyanis, hogy alacsony ambiens hőmérsékleten (15°C) a vírusról, vagy a transzgénről keletkező kisRNS-ek mennyisége meglehetősen lecsökken. Ennek következményeként hidegben a növények sokkal fogékonyabbak a vírusfertőzésre. Ezzel ellentétben, az RNS csendesítés aktivitása, és az antivirális és transzgén eredetű kisRNS-ek mennyisége fokozatosan növekszik a hőmérséklet emelkedésével.

Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, hogy azonosítsuk a növényi hőmérsékletérzékelésben szerepet játszó kisRNS-eket *Arabidopsis thaliana* modelnövényben. Ehhez három különböző ambiens hőmérsékleten nevelt növények csíranövény, gyökér, levél és virágzat mintáit használtuk fel, amelyekből cDNS könyvtárakat hoztunk létre. Kérdéseink megválaszolásához az újgenerációs szekvenálást kombináltuk bioinformatikai és molekuláris biológiai módszerekkel.

Mivel elsősorban humán és állati mintákra kidolgozott kisRNS cDNS könyvtárkészítő kitek álltak a rendelkezésünkre, ezért kutatásainkhoz elengedhetetlenül szükség volt az újgenerációs szekvenáláshoz használt különböző könyvtárkészítési módszerek optimalizálására. A különböző növények, és azok eltérő szöveteiből, szerveiből származó RNS kivonatok eltérő preparációt igényelnek, ezt szintén a munkánkhoz alakítottuk. Ahhoz, hogy a miRNS-ek által elvágott mRNA target géneket genomszinten tudjuk azonosítani, úgynevezett degradome cDNS könyvtárakat készítettünk. Ez egy nagyáteresztő képességű kísérleti módszer, amit a vágástermékek detektálására állítottunk be a laboratóriumunkban (German és mtsai. 2008).

Annak érdekében, hogy a további kutatások során bonyolultabb kérdéseket is meg tudjunk válaszolni, célul tűztük ki a kísérleti rendszerünk és a bioinformatikai elemzés módszerének kidolgozását. Ehhez elsőként a *Nicotiana benthamiana* szövetszintű miRNS profilját határoztuk meg. A *Nicotiana benthamiana* a különböző stresszfaktorok, mint a vírusfertőzések, gazda-patogén interakciók hatásának vizsgálatára egyik széles körben elterjedt modelnövénye, amit intézetünk több kutatócsoportja is használ munkái során.

A kutatómunka során használt főbb módszerek:

Genomi DNS izolálás, RNS izolálás, könyvtárkészítés újgenerációs szekvenáláshoz (mRNA szekvenáló könyvtár, kisRNS cDNS könyvtár, „degradome” könyvtár), Northern blot analízis, miRNS-ek kvantifikálása RT-PCR módszerrel, real-time kvantitatív PCR, metilációs mintázat vizsgálata Chop-qPCR-el, bioinformatikai elemzések

Eredmények

1. *N. benthamiana* csíranövény, gyökér, levél, szár és virág mintákból hatékonyan és jó minőségben készítettünk mRNA, kisRNS és „degradome” cDNS könyvtárakat.
2. Leírtunk a *N. benthamiana* vizsgált mintákban 40 már más fajokból ismert és korábban azonosított miRNS családot és megadtuk azok szövetszintű expressziós profilját. Jellemeztük a miRNS családok kezdő nukleotidbeli és méretbeli eloszlását, amely jelentős mértékben meghatározza az adott kisRNS funkcióját. A más fajokból már ismert miRNS-ek által hasított mRNA szekvenciákat elsőként azonosítottuk *N. benthamiana* növényben, amelyeket kísérleti úton tudtunk igazolni. Az ismert target mRNA szekvenciákon kívül 15 eddig nem ismert miRNS célpontot is azonosítottunk.
3. Bioinformatikai módszerekkel definiáltunk 18 új, *N. benthaminana* specifikus miRNS-t, amelyeket molekuláris biológiai módszerekkel is validáltunk. Megadtuk a miRNS-ek

méret szerinti eloszlását és a kezdő nukleotid összetételét is a mintáinkban. A „degradome” könyvtárak segítségével az új miRNS-ekhez 32 poszttranszkripcionálisan vágással szabályozott cél mRNS-t azonosítottunk.

4. Három különböző hőmérsékleten (15°C, 21°C és 27°C) nevelt *A. thaliana* Columbia ökotípus csíranövény, gyökér, levél, és virág mintákból hatékonyan és jó minőségben készítettünk mRNS, kisRNS és „degradome” cDNS könyvtárakat.
5. Az *A. thaliana* kisRNS könyvtárakból egy 378 egyedi miRNS szekvenciából álló halmazt hoztunk létre a miRBase adatbázisban elérhető és az általunk *de novo* prediktált miRNS-ekből a további elemzésekhez.
6. Azonosítottunk 50 hőmérséklet-szabályozott miRNS szekvenciát *Arabidopsisban*, amelyeknek megadtuk a szövetszintű expresszióját, és definiáltunk a „degradome” szekvenálásokból elérhető 133 target mRNS-t is.
7. A korábban már ismert miR169 család tagjait, mint ambiens hőmérséklet-szabályozott miRNS-t részletesebben megvizsgálva azt kaptuk, hogy közvetve befolyásolja a virágzási időt. A miR169 poszttranszkripcionálisan szabályozza a Nuclear Factor Y (NF-Y) transzkripció faktor A alegységét, amely trimer formában (NF-YA2, NF-YB2 és NF-YC9) regulálja a fő virágzási integrátor, az FT és a YUC2 expresszióját.
8. Megtaláltuk a legtöbb ismert phasiRNS lókuszt *Arabidopsisban*, és azonosítottunk eddig nem ismert tagokat is. A legtöbb phasiRNS lókuszt a vizsgálati körülményeink között szövet specifikusnak bizonyult, valamint a hőmérséklet emelkedésével alulszabályozott volt.
9. A legtöbb *de novo* prediktált kisRNS lókuszt esetén a 24 nt hosszúságú mérettartomány volt a domináns. Úgy találtuk, hogy globálisan mind a genomi elhelyezkedésük és az expressziós szintjük stabil, függetlenül az ambiens hőmérséklettől vagy a szövet típusától.
10. Definiáltunk néhány hőmérsékletfüggő 24 nt hosszúságú kisRNS lókuszt, amelyeket többnyire transzpozonokban és intergenikus régiókban találtunk meg. Ilyen például a YUC2 promóter régiójában található heterokromatikus kisRNS lókuszt. Megállapítottuk, hogy ez a szabályozási szint az auxin homeosztázis epigenetikai regulációjával hozható összefüggésbe.

Összefoglalás

A növények túlélése szempontjából a leginkább limitáló faktor a hőmérséklet, éppen ezért meglehetősen változatos morfológiai és fejlődésbiológiai eltéréseket mutatnak az ambiens

hőmérsékleti tartományon (12-27°C) belül. Az abiotikus szignálokhoz való alkalmazkodás egyik fő szabályzója a kisRNS-ek, amelyek transzkripcionálisan, és poszttranszkripcionálisan is befolyásolhatják a génexpressziót. Doktori dolgozatomban elsősorban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy *A. thaliana* modellnövényben milyen szabályzó szerepet töltenek be a kisRNS-ek a hőmérsékletadaptáció során. A miRNS profil meghatározásához kisRNS, és a miRNS vágástermékek azonosítására szolgáló „degradome” könyvtárakat készítettünk négy különböző szövetből (csíranövény, gyökér, levél, virág) három eltérő ambiens hőmérsékleten (15°C, 21°C és 27°C). Globálisan vizsgálva a kisRNS profilt, úgy találtuk, hogy a kisRNS lókuszoknak csupán egy kis hányadát (0,6%) szabályozza az ambiens hőmérséklet. A különböző kisRNS osztályokat részletesebben megvizsgálva azonban azonosítottunk hőmérsékletfüggő miRNS-eket és azok target génjeit. A miR169h-n-5p az egyik ilyen hőmérséklet szabályozott miRNS, amely célgénje, az NF-YA2 szintjét alacsonyan tartja alacsony ambiens hőmérsékleten. Az NF-YA2 a konzervált transzkripciós regulátor, az NF-Y heterotrimer komplex tagja, amely a virágzási idő központi integrátorának, az FT promóteréhez kötődik, így befolyásolja a virágzást. A megnövekedett NF-YA2 szint magas ambiens hőmérsékleten közreműködik az FT szint emelkedésében, ami korai virágzást eredményez. Egy másik kisRNS osztály, a phasiRNS-ek között is találtunk termoreszponzív lókuszokat, amelyek célgénjei különböző auxin útvonalban szereplő gének. A legnépesebb növényi kisRNS-ek a 24 nt hosszúságú heterokromatikus kisRNS-ek, amelyek esetén a transzpozonokban és az intergenikus régiókban figyeltünk meg dúsulást. Globális skálán nézve ezeknek a kisRNS-eknek a genomi elhelyezkedése és az expressziós szintje nagyon stabil, nem befolyásolja az ambiens hőmérséklet, vagy a szövet típusa. Egy érdekes hőmérsékletfüggő 24-es lókuszt találtunk a YUC2 gén promóter régiójában is, ami az auxin homeosztázis epigenetikai regulációjában játszhat fontos szerepet. Eredményeink a miRNS-ek, és az egyéb kisRNS osztályok, mint a phasiRNS-ek, tRNS fragmentek, 24 nt heterokromatikus lókuszok abiotikus válaszokban betöltött igen változatos szerepének megértésében segítik a növénybiotechnológusokat.

Munkánk során egy másik fontos modelnövény, a *N. benthamiana* miRNS profilját és a miRNS-ek vágással szabályozott célgénjeit is leírtuk csíranövény, gyökér, levél, szár és virág mintákból, két különböző forrásból származó növényből. Ehhez szintén kisRNS és „degradome” szekvenálási stratégiát alkalmaztunk. Az újgenerációs szekvenálást követően bioinformatikai elemzésekkel és Northern blottal validáltuk az eredményeinket. A vizsgált minták alapján meghatároztuk a *N. benthamiana* részletes szövetszintű miRNS expressziós mintázatát, azonosítottunk 40 konzervált miRNS családot, és 18 új, *N. benthamiana* specifikus

miRNS-t is. Egy nagy áteresztőképességű technológia adaptálásával validáltuk a miRNS-ek cél mRNS-eit is, amelyek közül több új targetet is elsőként írtunk le. Mivel a *N. benthamiana* a biotikus stresszfaktorok (vírusfertőzések, gazda-patogén interakciók) tanulmányozásában intézetünkben és világszerte is kedvelt modelnövény, eredményeink sokak által hasznosítható, böngészhető új adatokkal járul hozzá további kutatásokhoz.

Publikációs lista

Az értekezés alapját képező saját közlemények:

Baksa I, Nagy T, Barta E, Havelda Z, Várallyay É, Silhavy D, Burgyán J, Szittya G Identification of *N. benthamiana* microRNAs and their targets using high throughput sequencing and degradome analysis **BMC Genomics**, 2015 Dec 1;16:1025.

Gyula P, **Baksa I**¹, Tóth T, Mohorianu I, Dalmay T, Szittya G Ambient temperature regulates the expression of a small set of sRNAs influencing plant development through NF-YA2 and YUC2 **Plant Cell Environment**, 2018;1-14

¹társ-elsőszerző

Könyvfejezet:

Baksa I.*, Szittya G. (2017) Identification of ARGONAUTE/Small RNA Cleavage Sites by Degradome Sequencing. In: Carbonell A. (eds) Plant Argonaute Proteins. **Methods in Molecular Biology**, vol 1640. Humana Press, New York, NY

*levelező szerző

Egyéb közlemények:

Taller D, Bálint J, Gyula P, Nagy T, Barta E, **Baksa I**, Szittya G, Taller J, Havelda Z. Expansion of *Capsicum annuum* fruit is linked to dynamic tissue-specific differential expression of miRNA and siRNA profiles. **PLoS One**. 2018 Jul 25;13(7):e0200207.

Czotter N, Molnár J, Szabó E, Demián E, Kontra L, **Baksa I**, Szittya G, Kocsis L, Deák T, Bisztray G, Tusnády G, Burgyán J, Várallyay É NGS of Virus-Derived Small RNAs as a Diagnostic Method Used to Determine Viromes of Hungarian Vineyards **Front Microbiol.** 2018; 9: 122.

Poszter prezentáció:

1. **Baksa I**, Nagy T, Havelda Z, Silhavy D, Burgyán J, Barta E, Szittya G Identification of the transcriptome, small RNA pattern and their targets in a model plant by high-throughput sequencing. **A Magyar Biokémiai Egyesület 2014. évi Vándorgyűlése**, Debrecen
2. **Baksa I**, Mohorianu I, Dalmay T, Szittya G The role of small RNAs in ambient temperature sensing in plants **Danube Scientific Conferences on Epigenetics**, 2014, Budapest

Szakmai előadások tudományos konferencián angol és magyar nyelven:

1. **Baksa I**, Nagy T, Havelda Z, Silhavy D, Burgyán J, Barta E, Szittya G *N. benthamiana* mRNS és sRNS expressziós profiljának meghatározása újgenerációs szekvenálással. **"Genetikai Műhelyek Magyarországon" XII. Minikonferencia**, 2013, Szeged
2. **Baksa I**, Nagy T, Havelda Z, Silhavy D, Burgyán J, Barta E, Szittya G *N. benthamiana* sRNS expressziós profiljának meghatározása újgenerációs szekvenálással. **Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Tudományos Napok**, 2013, Gödöllő
3. **Baksa I**, Nagy T, Havelda Z, Silhavy D, Burgyán J, Barta E, Szittya G Identification of the *N. benthamiana* transcriptome, small RNAs and their targets by high-throughput sequencing. **Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK 2014)**, Szeged
4. **Baksa I**, Nagy T, Havelda Z, Silhavy D, Burgyán J, Barta E, Szittya G *N. benthamiana* kis RNS profiljának elemzése bioinformatikai módszerekkel. **Fiatal Kárpátaljai Kutatók X. Konferenciája**, 2014, Beregszász
5. **Baksa I**, Mohorianu I, Dalmay T, Szittya G Kis RNS-ek a növényi hőmérséklet érzékelésben. **Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Tudományos Napok**, 2014, Gödöllő (előadói I. díj)
6. **Baksa I**, Mohorianu I, Dalmay T, Szittya G Small regulatory RNAs in response to ambient temperature sensing in *Arabidopsis*. **Hungarian Molecular Life Sciences**, 2015, Eger
7. **Baksa I**, Gyula P, Mohorianu I, Dalmay T, Szittya G Small RNA-based regulation during temperature adaptation in *Arabidopsis*. **Danube Scientific Conferences on Epigenetics**, 2016, Budapest

8. **Baksa I**, Gyula P, Mohorianu I, Dalmay T, Szittya G Egy miRNS család szerepe a hőmérséklet adaptációban. **Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Tudományos Napok**, Gödöllő, 2016 (előadói II. díj)

Irodalomjegyzék

- German, Marcelo A, Manoj Pillay, Dong-Hoon Jeong, Amit Hetawal, Shujun Luo, Prakash Janardhanan, Vimal Kannan, és mtsai. 2008. „Global identification of microRNA–target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends”. *nature biotechnology* 26: 941–46.
- Kumar, S. Vinod, és Philip A. Wigge. 2010. „H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis”. *Cell* 140 (1): 136–47.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.006>.
- Szittya, György, Dániel Silhavy, Attila Molnár, Zoltán Havelda, Ágnes Lovas, Lóránt Lakatos, Zsófia Bánfalvi, és József Burgyán. 2003. „Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation”. *EMBO Journal* 22 (3): 633–40.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg74>.